

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
峰 晴 昭 仁	主 査 教 授 竹 中 洋 主 査 教 授 窪 田 隆 裕 副 査 教 授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教 授 林 秀 行 副 査 教 授 南 敏 明
主論文題名 Endolymphatic perfusion with EGTA-acetoxymethyl ester inhibits asphyxia- and furosemide-induced decrease in endocochlear potential in guinea pigs (内リンパ腔への EGTA-Acetoxymethyl Ester (EGTA-AM) の投与は無呼吸負荷や利尿剤投与による蝸牛内電位の低下を抑制する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>正の蝸牛内電位(endocochlear potential, EP)は蝸牛の血管条組織で作られ、有毛細胞が音の振動刺激を電気変換する時に欠くことの出来ない直流電圧であるが、この発生機序は未だ確定されていない。本研究では、モルモットを用いてEPの発生に対する内リンパ液 Ca^{2+}濃度 ($[Ca]_e$)と内リンパ液周囲の細胞内 Ca^{2+}濃度 ($[Ca]_i$)の影響を調べた。</p> <p>《方 法》</p> <p>実験動物には Preyer 反射陽性の Hartley 系モルモット(300-400g)を使用し、Pentobarbital 腹腔内麻酔(28mg/kg)後、気管切開下に人工換気を行った。$[Ca]_e$測定には polyvinyl chloride (PVC)を使用した Ca イオン電極(PVC-Ca 電極)を用いた。EP 測定用の 0.5 M KCl 電極と PVC-Ca 電極は、蝸牛第二回転より経血管条的に内リンパ腔に刺入した。EP 測定用電極と PVC-Ca 電極からの入力信号は差動型エレクトロメーターに接続し、その出力信号を MacLab 8s と 2 チャンネルペンレコーダに記録した。無呼吸負荷は人工呼吸器を一過性に約 2 分間停止させて行い、フロセミドはリンゲル液に溶解し(60mg/kg)、頸静脈より約1分間で投与した。得られた実験データの有意差は ANOVA's test を用いて検定し、$p < 0.05$ を有意とした。</p> <p>《結 果》</p> <p>1) PVC-Ca 電極を用いて $[Ca]_e$ を測定すると 10^{-6} M もしくはそれ以下であり、約 2 分間の無呼吸負荷やフロセミド(60 mg/kg)の静脈内投与では、EP の著明な低下と共に $[Ca]_e$ の 10^{-3} M 程度までの上昇が観察された。また、各実験から得られた EP と pCa ($-\log [Ca]_e$)の間には有意な相関が認められた ($r = 0.998$)。このことは、①EP が血管条を介する Ca^{2+} の濃度勾配により発生する、②血管条を構成する組織が Ca^{2+} 透過性を持ち、$[Ca]_e$ は EP の変化に追従する、という二つの可能性を示唆している。</p> <p>2) そこで、10 mM EGTA 溶液を内リンパ腔に灌流すると $[Ca]_e$ は低下したが EP は変化せず、無呼吸負荷による EP の低下も抑制されなかった。これに対し、高濃度の Ca^{2+} 溶液を内リンパ腔に灌流す</p>	

るとEPは低下し、灌流液のCa²⁺濃度とEPの間に有意な相関が得られた(r = 0.982)。この結果は、血管条にはCa²⁺透過性が存在するが、[Ca]_oが低い時には血管条を介したCa²⁺の濃度勾配がEPに影響を与えないことを示唆している。

- 3) 0.3 mM の細胞膜透過性を持つEGTA誘導體 (EGTA-Acetoxyethyl Ester, EGTA-AM)溶液を内リンパ腔に投与するとEPは徐々に上昇し、無呼吸負荷やフロセミド投与によるEPの低下を60-80%抑制した。しかし、外リンパ腔に0.5 mMのEGTA-AM溶液を投与しても、無呼吸負荷によるEPの低下は抑制されなかった。これらのことは[Ca]_i、特に辺縁細胞内のCa²⁺濃度がEPの発生もしくは維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。

《考 察》

PVC-Ca電極を用いて[Ca]_oを測定すると10⁻⁶ M以下であり、従来報告されている値よりも低値であったが、この電極は内リンパ腔刺入後も低いCa²⁺濃度の液に正確に反応しており、本実験で得られた結果は妥当なものと考えられた。また、内リンパ腔を低Ca²⁺液で灌流してもEPは変化しないが、高Ca²⁺液で灌流するとEPが低下する事から、血管条を介するCa²⁺の透過性は存在するが、正常条件ではEPに影響を与えるようなCa²⁺コンダクタンスは存在しないことが明らかとなった。さらに、EGTA-AM溶液の内リンパ腔投与実験から、[Ca]_iがEPの発生もしくは維持に重要な役割を果たしていると考えられた。外リンパ腔へのEGTA-AM溶液の投与結果を併せて考えると、EPの発生もしくは維持には辺縁細胞内のCa²⁺濃度が重要な役割を果たしているものと推察された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	峰 晴 昭 仁
論文審査担当者		主 査 教 授 竹 中 洋 主 査 教 授 窪 田 隆 裕 副 査 教 授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教 授 林 秀 行 副 査 教 授 南 敏 明	
主論文題名 Endolymphatic perfusion with EGTA-acetoxymethyl ester inhibits asphyxia- and furosemide-induced decrease in endocochlear potential in guinea pigs (内リンパ腔への EGTA-Acetoxymethyl Ester (EGTA-AM) の投与は無呼吸負荷や利尿剤投与による蝸牛内電位の低下を抑制する)			
論文審査結果の要旨			
<p>正の蝸牛内電位 (endocochlear potential, EP) は蝸牛の血管条組織で作られ、有毛細胞が音の振動刺激を電気変換する時に欠くことの出来ない直流電圧である。しかし、EP の発生機序は未だ確定されていない。</p> <p>申請者は Hartley 系モルモットを用い、蝸牛第二回転に微小な小孔を作製し、そこから経血管条的に EP 測定用の 0.5 M KCl 電極と PVC-Ca 電極を穿刺し、EP と内リンパ液の Ca^{2+} 濃度 ($[Ca]_e$) の経時的变化を記録し、以下のような結果を得ている。</p> <p>PVC-Ca 電極を用いて $[Ca]_e$ を測定すると、従来報告されている値よりも低く 10^{-6} M もしくはそれ以下であった。約 2 分間の無呼吸負荷やフロセミド (60 mg/kg) の静脈内投与により、EP の著明な低下と $[Ca]_e$ の 10^{-3} M 程度までの上昇を観察し、これらの各実験から得られた EP と $pCa (-\log [Ca]_e)$ の間に有意な相関を認めている。しかし、低濃度の Ca^{2+} 溶液を内リンパ腔灌流して $[Ca]_e$ を変化させても EP が変化せず、10^{-2} M 以上の高濃度の Ca^{2+} 溶液の内リンパ灌流において EP が変化したことから、正常条件では EP に影響を与えるような血管条を介する Ca^{2+} コンダクタンスは存在しないが、Ca^{2+} の透過性自体は存在するものと考えている。さらに、0.3 mM の細胞膜透過性を持つ EGTA 誘導体 (EGTA-Acetoxymethyl Ester, EGTA-AM) を内リンパ腔に投与すると EP は徐々に上昇し、無呼吸負荷やフロセミド投与による EP の低下を 60-80% 抑制するが、外リンパ腔に 0.5 mM の EGTA-AM を投与しても無呼吸負荷による EP の低下は抑制されないことから、内リンパ腔を取り巻く細胞内の Ca^{2+} 濃度、特に辺縁細胞内の Ca^{2+} 濃度が EP の発生および維持に重要と考えている。</p> <p>本研究により、EP の発生および維持には $[Ca]_e$ ではなく、辺縁細胞内の細胞内 Ca^{2+} 濃度を維持する事が重要であると示唆された。特に末梢性感音難聴実験例では EP が低下する例も多く報告されていることから、本研究で得られた成果は末梢性感音難聴の治療にも寄与できる可能性が高いと考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌)			
Japanese Journal of Physiology 55(1): 53-60, 2005			